

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА ИЗ СОСТАВА GSNO ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТИОЛЬНОЙ ФОРМЫ ТИАМИНА

Степура А.И.

Институт биохимии НАН Беларуси, г. Гродно

In alkaline medium, the thiamine cyclic form is converted into a thiol form ($pK_a=9.2$) with an opened thiazole ring. The thiamine thiol form releases nitrogen oxide from S-nitrosoglutathione. Thiamine disulfide, mixed thiamine disulfide with glutathione and nitrogen oxide are produced in the reaction. Free glutathione was recorded in small amounts. The concentration of nitrogen oxide formed agreed well with the concentration of degraded glutathione.

Молекулы оксида азота влияют на метаболические процессы, как в самих клетках, так и расположенных по соседству. Это значит, что молекулы NO, несмотря на свою высокую активность, способны транспортироваться или в связанном состоянии диффундировать на расстояния превышающие клеточные размеры, по крайней мере, в несколько раз [1]. Поэтому предполагается, что NO может обратимо включаться в соединения, способные переносить NO от клеток доноров к клеткам мишеням его действия. Кандидатами на роль таких переносчиков в настоящее время выступают S-нитрозотиолы [2,3]. S-нитрозотиолы значительно более стабильные соединения при физиологических условиях, по сравнению с оксидом азота. Время полупревращения, например, S-нитрозоглутатиона или S-нитрозоальбумина более 10 часов, а S-нитрозоцистеина более 90 мин. [4].

В плазме крови содержатся микромолярные концентрации S-нитрозоглутатиона (GSNO) и S-нитрозоальбумина [5]. Освобождение NO из состава S-нитрозотиолов возрастает в присутствии, GSH, цистеина [3,4]. Предполагается, что реакции взаимодействия между S-нитрозотиолами и низкомолекулярными тиолами и белками содержащими сульфгидрильные группы играют важную роль в регуляции функций NO в организме [3]. Как известно, тиамин и его производные легко образуют тиольную форму в щелочных средах [6,7]. В данной работе мы исследовали взаимодействие тиольной формы тиамина в аэробных и в анаэробных условиях с GSNO. Мы показали, что тиольная форма тиамина высвобождает NO из состава GSNO.

Методы исследования

Концентрацию водных растворов тиамина в нейтральной среде рассчитывали по спектрам поглощения, используя коэффициент молярной экстинкции для полосы поглощения с $\lambda=233$ нм, $\epsilon=12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH=7.0 [6]. Концентрацию тиольной формы тиамина в щелочных средах

определяли спектрофотометрически по возрастанию поглощения в области 250 нм при переходе от нейтральной среды к щелочной. Содержание дисульфидной формы тиамин определяли после инкубации с избытками глутатиона или цистеина в нейтральной среде. Дисульфидная форма тиамин вследствие тиолдисульфидного обмена превращается в форму с закрытым тиазоловым циклом [7]. Концентрацию тиамин с закрытым тиазоловым циклом определяли флуоресцентным методом, после окисления тиамин в тиохром щелочным феррицианидом [7]. Максимум возбуждения флуоресценции тиохрома в нейтральной среде равен 365 нм, а максимум флуоресценции равен 450 нм. [8].

Количество оксида азота, выделившегося при распаде S-нитрозоглутатиона под действием тиольной формы тиамин в анаэробных условиях, контролировали по образованию нитрозоНб спектрофотометрическим методом [9]. Количество сульфгидрильных групп определяли с помощью реактива Элмана. В атмосфере воздуха выделение оксида азота из состава S-нитрозоглутатиона под действием тиольной формы тиамин регистрировали по образованию нитрита. Концентрацию нитрита измеряли с помощью реактива Грисса, регистрируя поглощение при 530 нм. Концентрацию нитратов измеряли также с помощью реактива Грисса, но после предварительной инкубации нитратов с пластинками металлического кадмия [3].

Высвобождение оксида азота из состава GSNO в анаэробных условиях и в атмосфере под действием тиольной формы тиамин

Для регистрации NO в анаэробных условиях использовали модифицированную кювету Тунберга [8].

В прямоугольную кювету вносили НbO₂. К прямоугольной кювете присоединен сосуд Варбурга с боковым отростком. Водный раствор GSNO помещали в центральный сосуд Варбурга, а в боковой отросток помещали раствор тиамин. Затем откачивали воздух из объема сосуда с помощью форвакуумного насоса. ОксиНб превращался в дезоксиНб, что сопровождалось характерными изменениями в спектре поглощения. Затем в центральный сосуд Варбурга содержащий водный раствор GSNO из бокового отростка переливали раствор тиамин.

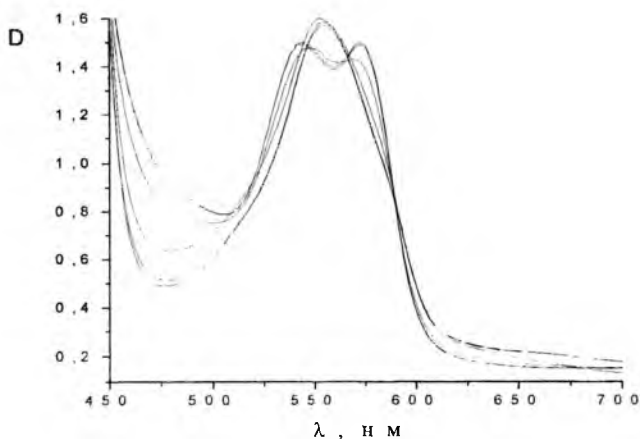
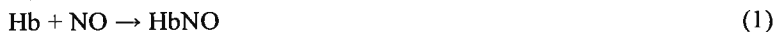


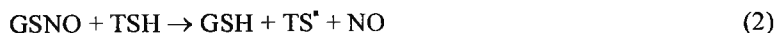
Рис. 1. Кинетика образования нитрозогемоглобина в анаэробных условиях, измеренная с помощью десатуратора, состоящего из прямоугольной кюветы, к которой присоединен сосуд Варбурга. Спектр поглощения исходного дезоксиНб, помещенного в прямоугольную кювету (1) и дезоксиНб после инкубации в анаэробных условиях через 10 мин. (2), 20 мин. (3), 30 мин. (4), 45 мин. (5), 60 мин. (6) после смешивания при 37 °С тиамин и GSNO в сосуде Варбурга. Концентрация тиамин - $2 \cdot 10^{-3}$ М, концентрация GSNO 10^{-3} М, pH растворов равно 8,7. Реакция запускалась после переливания тиамин из бокового отростка в центральную часть сосуда Варбурга, содержащего раствор GSNO.

После смешивания GSNO и тиамин наблюдали выделение пузырьков газа. NO, который диффундировал в прямоугольную кювету, содержащую дезоксиНб. Концентрация NO, выделившуюся при распаде нитрозоглутатиона регистрировали по образованию нитрозогемоглобина (рис. 1).



В свою очередь, в присутствии GSNO наблюдали резкое ускорение окисления тиольной формы тиамин в дисульфид тиамин (TSST).

Это позволяет предположить, что взаимодействие тиольной формы тиамин с GSNO протекает следующим образом:



Где TSST –дисульфидная форма тиамин.

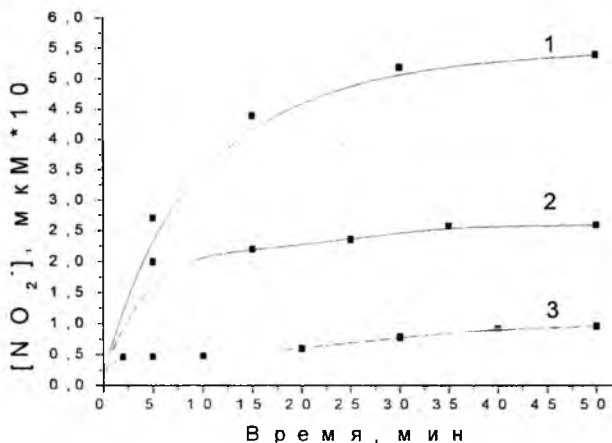


Рис. 2. Выход оксида азота (нитритов) из водного раствора GSNO под действием тиольной формы тиамин в зависимости от концентрации тиамин. Количество выделившегося оксида азота измеряли по количеству нитрита, образовавшегося в сосуде с водой после барботирования через него газовой смеси из реакционной системы. Значение pH растворов равно 9,8, концентрация тиамин 1. - 10^{-3} , 2. - $5 \cdot 10^{-3}$, 3. - 10^{-4} М. Концентрация GSNO - 10^{-3} М. Измерения проводили в атмосфере воздуха.

Концентрация выделившегося глутатиона была незначительной и составляла лишь несколько процентов от исходной концентрации GSNO.

Это, вероятно, связано с образованием смешанного дисульфида в реакции TSST с GSH.

После инкубации тиамин с GSNO в щелочной среде в атмосфере воздуха симбатно с разрушением GSNO возрастало в растворе содержание нитрита (рис. 2). Поэтому можно предположить, что в присутствии кислорода выделившийся оксид азота трансформировался в основном в нитрит вследствие протекания следующих реакций:



Нитрат мы не определили в реакции с металлическим кадмием. Поэтому количество нитрита соответствует с хорошей точностью, количеству выделившегося оксида азота в атмосферу воздуха.

Обсуждение результатов

Мы предполагаем, что тиольная форма тиамин, наряду с внутриклеточными тиолами [2,3], аскорбиновой кислотой [2] а также сульфгидрильными группами цистеиновых остатков белков [2] вносит вклад в высвобождение оксида азота из лабильного физиологического депо, компонентом которого является S-нитрозотиолы белков [4].

Тиольная форма тиамин достаточно эффективно взаимодействует с дисульфидными группировками белков. Предполагается, что путем образования смешанных дисульфидов до 30% тиамин связано с белками сердца. Мы полагаем, что вследствие протекания обменных реакций между тиольной формой тиамин и S-нитрозоцистеиновыми остатками белков может происходить высвобождение оксида азота и образовываться смешанные тиамин-белковые дисульфиды. Особенно возрастает эффективность данных реакций для фосфатов тиамин, в том числе и некоферментной природы - ТМФ, ТТФ. В этом случае в связывании тиаминных эфиров с белками участвуют как положительно заряженные остатки имидазола, аргинина, лизина макромолекул так и отрицательно заряженные фосфатные остатки производных тиамин.

Высокая равновесная константа связывания тиольных тиаминных эфиров с белками может в принципе обеспечить в конечном итоге, эффективное высвобождение оксида азота даже малым количеством тиольной формы тиаминных эфиров.

Дисульфидная форма тиамин, а также смешанные дисульфиды тиамин (в том числе дисульфиды эфиров тиамин) достаточно легко восстанавливаются тканевыми низкомолекулярными тиолами с образованием циклической формы тиамин с закрытым тиазоловым циклом.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант БОЗМС-058.

Литература

1. Davis K.L., Martin E., Turko I.V. and Murad F. (2001) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41, 203-236.
2. Arnelle D. R. and Stamler J. S. (1995) Arch. Biochem. Biophys. 318, 279-285.
3. G. Scorza, D. Pietraforte and M. Minetti. Free Radical Biol. and Medicine, 22 (1997) p. 633-642.
4. Minamiyama Y., Takemura S., Inoue M. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) Aug 5; 225(1):112-5.
5. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.L., Keaney J., Vita J., Singel B., Valeri G.R., Loscalzo J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7674-76-77.
6. Островский Ю.М., Степура И.И., Шелленбергер А., Хюбнер Г., Биохимия (1971) т. 36, с. 1222-1227.
7. Березовский В.М. Химия витаминов (1973), Пищевая промышленность.
8. Степура И. И., Пилецкая Т.П., Степура В.И., Маскевич С.А. (1997) Биохимия, т. 62, с. 1648-1654.
9. Степура И.И., Чайковская Н.А, Водоевич В.П., Виноградов В.В. Биохимия, (1999) т. 64 с. 106-110.